

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>G01N 33/68, C07K 7/06, 7/08, C12P 21/08, A61K 39/395</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 95/04282</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>9. Februar 1995 (09.02.95)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP94/00164</b>		(81) Bestimmungsstaaten: CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>21. Januar 1994 (21.01.94)</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(30) Prioritätsdaten: <b>PCT/EP93/02010 28. Juli 1993 (28.07.93)</b> (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: <b>WO DE usw.</b>			
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): <b>BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).</b>			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>NASER, Werner [DE/DE]; Am Meisteranger 18, D-82362 Weilheim (DE). HUBER, Erasmus [DE/DE]; St. Willibald 10, D-86923 Finning (DE). SEIDEL, Christoph [DE/DE]; Steinstrasse 6B, D-82362 Weilheim (DE). ESSIG, Ulrich [DE/DE]; Josef-von-Hirsch-Strasse 51, D-82152 Planegg (DE).</b>			
(74) Anwälte: <b>SCHREINER, Siegfried usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 16, D-68305 Manheim (DE).</b>			
(54) Title: <b>IMMUNOASSAY FOR DETECTING COLLAGEN OR COLLAGEN FRAGMENTS</b>			
(54) Bezeichnung: <b>IMMUNOASSAY ZUM NACHWEIS VON KOLLAGEN ODER KOLLAGENFRAGMENTEN</b>			
(57) Abstract			
An immunoassay is disclosed for detecting collagen or collagen fragments in a sample by using an antibody that recognises a synthetic linear peptide corresponding to a sequence of non-helical C or N terminal area of collagen, said sample being preferably denatured.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft einen zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten in einer Probe unter Verwendung eines Antikörpers, der ein synthetisches lineares Peptid erkennt, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht, wobei die Probe vorzugsweise denaturiert wird.			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tadschikistan
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten**

Die Erfindung betrifft einen Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten in einer Probe unter Verwendung mindestens eines Antikörpers, der ein synthetisches lineares Peptid erkennt, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht, wobei die Probe vorzugsweise denaturiert wird.

Kollagen stellt ein wichtiges Strukturprotein im Bindegewebe von Haut, Knorpel und Knochen dar. Bekannt sind 11 Typen, die jeweils aus drei Ketten bestehen. Jeder Typ setzt sich aus 1 - 3 verschiedenen Ketten zusammen, die als  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  bezeichnet werden (E. Miller et al. in Methods in Enzymology 144, Structural and Contractile Proteins, ed. L. Cunningham, Academic Press Inc. 1987, p. 3 - 41). Eine charakteristische Eigenschaft des reifen Kollagens bestimmter Gewebe, wie insbesondere Knochen oder Knorpel, ist die Quervernetzung von nebeneinander liegenden Fasern durch Hydroxylysylpyridinolin oder Lysylpyridinolin (D. Fujimoto et al., J. Biochem 83 (1978), 863 - 867; D. Eyre et al., Ann. Rev. Biochem 53 (1984), 717-748 und D. Eyre, Methods in Enzymology 144 (1987), 115-139). Diese Quervernetzungen können als biochemischer Marker für den spezifischen Nachweis von Kollagen genutzt werden (Z. Gunja-Smith et al., Biochem. J. 197 (1981), 759-762). Beim Abbau von extrazellulärem Kollagen

- 2 -

gelangen Hydroxylysylpyridinolin- oder Lysylpyridinolin-Derivate, welche Peptidseitenketten enthalten oder freie Pyridinolin-Derivate mit Lysyl- oder Hydroxylysylresten, wie in der WO 91/10141 beschrieben, in Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin. Der Nachweis dieser Verbindungen in Körperflüssigkeiten ergibt daher Hinweise auf den Abbau von extrazellulärem Kollagen, wie er z.B. bei der Osteoporose sowie infolge von Tumoren des Knochengewebes auftritt. Zum Nachweis von solchen Hydroxylysyl- oder Lysylpyridinolinen mit Peptidseitenketten wurden in der WO 89/12824 monoklonale Antikörper beschrieben, welche durch Immunisierung mit entsprechenden quervernetzten Kollagenfragmenten erhalten wurden, die aus dem Urin isoliert werden können. Auch bei dem in WO 91/08478 beschriebenen Verfahren erfolgt der Nachweis von Kollagen über einen Antikörper gegen natürliche, d.h. in vivo erzeugte quervernetzte Abbauprodukte von Kollagen.

Ein Nachteil dieser aus natürlichen Quellen isolierten Peptide ist, daß keine sichere Quelle für eine reproduzierbare Herstellung der Antigene oder Bindepartner im Test vorhanden ist. Ein weiterer Nachteil der aus natürlichen Quellen isolierten Peptide ist die Gefahr einer Kontamination mit infektiösem Material.

Definierte Antigene können z.B. durch chemische Synthese eines Peptids erhalten werden, welches einem Epitop des Antigens entspricht. Werden hierfür kleine Peptide mit einem Molekulargewicht von etwa 700 - 1500 D verwendet, so ist die Bindung an ein Trägermolekül erforderlich, um ein Antigen mit immunogener Wirkung zu erhalten. Durch die Bindung an das Trägermolekül darf dabei die Struktur des Epitops nicht verändert werden. Die Kupplung an das Trägermolekül erfolgt daher bislang bevorzugt an den Enden der Peptidkette in

- 3 -

ausreichendem Abstand von dem vermuteten Epitopbereich (Laboratory Technics in Biochemistry and Molecular Biology, Synthetic Polypeptides as Antigens, Editors R.H. Burdon und P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 1988, Seiten 95-100).

Ein Problem bei der chemischen Synthese eines definierten Antigens, das einem natürlichen Abbauprodukt von quervernetztem Kollagen entspricht, stellt die aus der Quervernetzung resultierende Hydroxylysyl- oder Lysylpyridinolin-Struktur dar, deren chemische Synthese aufwendig ist.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein definiertes Antigen zur Herstellung von Antikörpern gegen Kollagen oder Kollagenfragmente, zum Einsatz als spezifischer Bindepartner des Antikörpers gegen Kollagen oder Kollagenfragmente in einem kompetitiven Immunoassay und als Standardmaterial zur Erstellung einer Standard- oder Eichkurve in einem kompetitiven Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten zur Verfügung zu stellen.

Bisher wurde immer davon ausgegangen, daß es zum Nachweis der Kollagen oder Kollagenabbauprodukte in einer Probe notwendig sei, die Quervernetzungsstrukturen an sich oder sogenannte quervernetzte Peptide, die durch die Quervernetzung der Hydroxylysyl- oder Lysylreste zustandekommen, nachzuweisen, da diese Hydroxylysyl- oder Lysylpyridinolinstruktur charakteristisch für Kollagen ist. Beispiele für solche Nachweismethoden sind in der WO 89/12824, WO 91/08478, WO 89/04491 und der WO 91/10141 beschrieben.

- 4 -

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß es zur Lösung der oben genannten Aufgabe ausreicht, ein definiertes Antigen, einen Bindepartner oder ein Standardmaterial zu verwenden, das ein synthetisches lineares Peptid enthält, das einer Sequenz des nichthelikalen linearen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht. Die Vorteile bei Verwendung von synthetischen linearen Peptiden zur Verwendung als Bindepartner in Immunoassays, als Standardmaterial oder als Immunogen bei der Antikörper-Herstellung liegen darin, daß diese Peptide, im Gegensatz zu Peptiden aus natürlichen Quellen, in genau definierter Struktur reproduzierbar hergestellt werden können. Zudem zeigt ein Immunoassay, in dem solche kurzen synthetischen Peptide eingesetzt werden, eine geringere Störanfälligkeit.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein kompetitiver Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten in einer Probe, der dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Bindepartner, der ein synthetisches lineares Peptid enthält, das einer Sequenz des nichthelikalen linearen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht, mit einem Antikörper, der das synthetische lineare Peptid zu binden vermag, und der Probe inkubiert und die Bindung des Antikörpers an den Bindepartner in geeigneter Weise bestimmt wird.

Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, die Probe beziehungsweise das in dieser Probe enthaltene Kollagen oder die Kollagenfragmente zu denaturieren und die Epitope so der Bindung des Antikörpers besser zugänglich zu machen. Am geeignetsten wird die Probe vor der Inkubation mit dem Antikörper mit dem Denaturierungsmittel für Proteine, die dem Fachmann bekannt sind, vorbehandelt. Um die Beeinträchtigung der immunologischen Reaktion zwischen der Probe und den

- 5 -

spezifischen Antikörpern möglichst gering zu halten oder gänzlich zu vermeiden, wird die denaturierte Probe vor der Inkubation mit dem Antikörper bevorzugt noch verdünnt. Als Denaturierungsmittel sind alle dem Fachmann bekannten Mittel hierfür geeignet. Kaliumrhodanid (KSCN) in einer Konzentration von 2 - 6 M und Tetradecyltriäthylammoniumbromid (TTAB) in einer Konzentration von 0,5 - 2 M haben sich als besonders geeignet zur Denaturierung erwiesen.

Durch die Einführung eines Denaturierungsschrittes der Probe konnten Antikörper, die gegenüber nicht-denaturierten Proben nur eine unwesentliche Bindung aufzeigten, zusätzlich genutzt werden, das heißt, sie binden sehr gut eine denaturierte Probe. Durch die Einführung dieses Denaturierungsschrittes stehen daher mehr Antikörper für einen diagnostischen Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten zur Verfügung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Standardmaterial zur Erstellung einer Standard- oder Eichkurve in einem kompetitiven Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antigen enthalten ist, das ein synthetisches Peptid, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereichs von Kollagen entspricht, enthält.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Antigen zur Herstellung von Antikörpern gegen Kollagen oder Kollagenfragmente, das ein synthetisches lineares Peptid, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereichs von Kollagen entspricht, enthält sowie die mit diesem Antigen hergestellten Antikörper.

- 6 -

Als synthetische lineare Peptide sind alle zusammenhängenden Aminosäuresequenzen des nichthelikalen C-oder N-terminalen Bereichs von Kollagen geeignet. Diese Bereiche sind aus Chu et al., Nature 310, 337-340 (1984), Click et al., Biochemistry 9, 4699-4706 (1970), Morgan et al., J. Biol. Chem. 245, 5042-5048 (1970) und Bernard et al., Biochemistry 22, 5213-5223 (1983) bekannt. Bevorzugt werden Peptide aus 5 bis 25 Aminosäuren, besonders bevorzugt aus 8 bis 20 Aminosäuren, verwendet. Dabei ist es nicht notwendig, daß die Sequenz den Bereich der Quervernetzung umfaßt. Sie kann aber sehr wohl ebenfalls mit diesem Bereich überlappen. In keinem Fall liegt aber in dem synthetischen Peptid eine Hydroxy-lysyl- oder Lysylpyridinolin-Quervernetzung vor. Am geeignetesten haben sich die synthetischen Peptide aus dem C-terminalen Bereich von Kollagen erwiesen, da der nichthelikale C-terminalen Bereich größer als der nichthelikale N-terminalen Bereich von Kollagen ist. In diesem Bereich stehen somit mehr potentielle Epitope als in den N-terminalen Bereich zur Verfügung. Peptide mit der in SEQ ID NO 1, 2, 3 oder 4 gezeigten Sequenz aus dem C-terminalen Bereich der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen sind besonders geeignet.

Die Konzentration von Abbauprodukten von Kollagen ist ein wichtiger diagnostischer Marker für das Ausmaß einer Osteolyse. Mit Hilfe der synthetischen linearen Peptide ist es möglich, einen kompetitiven Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten durchzuführen. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß diese Peptide sehr gut mit den Kollagenfragmenten, die in natürlichen Proben wie Plasma, Serum oder Urin vorkommen, um Antikörper gegen diese Kollagenfragmente konkurrieren und damit einen kompetitiven Test ermöglichen. Solche Antikörper gegen Kollagen oder Kollagen-abbauprodukte sind kommerziell erhältlich, beispielsweise in

- 7 -

dem Telopeptide ICTP [ $^{125}\text{I}$ ] Radioimmunoassay Kit der Firma Orion Diagnostica, Finnland. Sie können aber bevorzugt erfundungsgemäß mittels des synthetischen linearen Peptids hergestellt werden.

Zum Einsatz in einem kompetitiven Immunoassay kann das synthetische lineare Peptid direkt als Bindepartner, der an eine Festphase gebunden ist, benutzt werden oder aber gekoppelt an eine zweite Komponente. Die Kopplung an die zweite Komponente erfolgt bevorzugt über die N- und C-terminale Aminosäuren des linearen Peptids. Gegebenenfalls kann zwischen dem Peptid und der zweiten Komponente noch ein Spacer eingefügt werden. Die zweite Komponente kann beispielsweise dazu dienen, das Peptid indirekt an eine Festphase zu koppeln. Beispiele hierfür sind dem Fachmann bekannt. Bevorzugt wird das Peptid an Rinderserumalbumin gekoppelt und das Kopplungsprodukt adsorptiv an eine Festphase zum Beispiel an Kunststoffröhren gebunden. Das Peptid kann auch an Biotin kovalent gebunden werden. Die Anheftung an die Festphase erfolgt dann über die Bindung an Avidin oder Streptavidin, das seinerseits an die Festphase gebunden wurde. Die zweite Komponente kann auch als Träger für mehrerer Peptide dienen, zum Beispiel in einem kompetitiven turbidimetrischen Inhibierung-Immunoassay (TINIA), wobei mehrere Peptide an beispielsweise Albumin, Immunglobuline,  $\beta$ -Galaktosidase, Polymere wie Polylysin oder Dextranmoleküle wie in der EP-A-0 545 350 beschrieben oder Partikel wie Latex gekoppelt sind. Vorzugsweise werden 30 bis 40 Peptidmoleküle je Trägermolekül gekoppelt. Das Peptid kann auch an eine Komponente, die eine Markierung darstellt, gekoppelt sein. Beispiele für all diese Testvarianten sind dem Fachmann bekannt.

Bei der Testführung kann der Antikörper gleichzeitig oder sequentiell mit der Probe sowie dem Bindepartner, der das synthetische lineare Peptid enthält, inkubiert werden. Anschließend wird in üblicher Weise die Menge des gebundenen oder nichtgebundenen Antikörpers bestimmt. Beispielsweise kann der verwendete Antikörper selbst markiert sein und diese Markierung direkt als Maß für den gebundenen oder ungebundenen Antikörper dienen. Es kann auch ein zweiter markierter Antikörper verwendet werden, der gegen den gebundenen oder nicht gebundenen Antikörper, beispielsweise gegen das Fc-Teil dieses Antikörpers, gerichtet ist. Als kompetitive Testvarianten zur Bestimmung der Menge an gebundenem oder ungebundenem Antikörper können beispielsweise Agglutinationstests, wie TINIA, oder FPIA- (Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay) (W. Dandliker et al., J. Exp. Med. 122 (1965), 1029), EMIT- (Enzyme Multiplied Immunoassay) (Gunzer et al., Kontakte III (1980), 3 - 11) und CEDIA-Prinzipien (Henderson et al., Clinical Chemistry 32 (1986), 1637 - 1641) dienen. Die erfundungsgemäßen Peptide haben sich als besonders geeignet für die Verwendung als definierte Bindepartner zur Kompetition mit der Probe um die Bindung an die Antikörper erwiesen. Besonders bevorzugt sind die synthetischen linearen Peptid mit der in SEQ ID NO 1, 2, 3 oder 4 gezeigten Sequenz.

Nach der Bestimmung des Ausmaßes der Bindung des Antikörpers an den Bindepartner, das ein Maß für die Menge an Antigen in der Probe darstellt, kann die genaue Menge an Antigen in der Probe in üblicher Weise durch Vergleich mit in gleicher Weise behandeltem Standard ermittelt werden.

- 9 -

Als Standard können Kollagenabbauprodukte isoliert aus natürlichem Material verwendet werden. Diese zeichnen sich jedoch naturgemäß durch eine bestimmte Schwankung aus. Geeigneter erwiesen hat sich als Standardmaterial ein Antigen, das das erfindungsgemäße synthetische lineare Peptid enthält. Das Antigen des Standards kann dabei lediglich aus diesem Peptid bestehen oder aber aus diesem Peptid, das an einen geeigneten Träger gekoppelt ist, der beispielsweise zur besseren Wasserlöslichkeit des Peptids dient. Zur Herstellung des Standardmaterials aus Peptid und Träger wird das lineare Peptid, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereichs von Kollagen entspricht, synthetisiert und über seine N- oder C-terminale Aminosäure durch geeignete Kopplungsmethoden an das Trägermolekül gebunden. Es können ein oder mehrere Peptide pro Trägermolekül gebunden werden. Gegebenenfalls kann die Kopplung über einen Spacer erfolgen. Für bestimmte Zwecke, wie beispielsweise für Agglutinationstests, kann es von Vorteil sein, mehrere erfindungsgemäße Peptide unterschiedlicher Sequenz an ein Trägermolekül zu binden, vor allem falls polyklonale Antikörper im Test eingesetzt werden, die nicht mit Hilfe des erfindungsgemäßen Antigens hergestellt wurden und damit meist mehrere Epitope erkennen.

Als Antikörper in dem kompetitiven Immunoassay können die bereits bekannten Antikörper gegen Kollagenabbauprodukte verwendet werden. Geeignet sind insbesondere Antikörper, die mit Hilfe eines Antigens, das das erfindungsgemäße lineare synthetische Peptid enthält, gewonnen wurden.

- 10 -

Zur Immunisierung werden die linearen synthetischen Peptide, die einer oder mehreren Sequenzen des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereichs von Kollagen entsprechen, bevorzugt an ein geeignetes Trägerprotein, wie zum Beispiel Keyhole Limpet Hemocyanine, Rinderserumalbumin oder Edestin gebunden werden.

Zur Herstellung dieser Antigene oder Immunogene werden zunächst die linearen Peptide in üblicher Weise chemisch synthetisiert. Anschließend erfolgt die Kopplung der synthetischen Peptide über die N-terminale Aminogruppe mittels Maleimidohexansäure-N-hydroxysuccinimidester an die oben genannten Trägerproteine. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß zur Herstellung von Antikörpern, die für die kompetitive Testführung geeignet sind, synthetische lineare Peptide mit der in SEQ ID NO 1, 2, 3 oder 4 gezeigten Sequenz besonders geeignet sind.

Mit den erfindungsgemäßen Antigenen, die ein synthetisches lineares Peptid enthalten, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereichs von Kollagen entspricht, ist es möglich, Antikörper zu erhalten, welche nicht nur das erfindungsgemäße Peptid sondern auch die in Körperflüssigkeiten vorkommenden Abbauprodukte von Kollagen erkennen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen Kollagen oder Kollagenfragmente durch Immunisierung mit einem erfindungsgemäßen Antigen und Isolierung des gewünschten Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren. Vorrangig erfolgt die Isolierung des gewünschten Antikörpers

- 11 -

über Immunadsorption an einem an ein Trägerprotein, vorzugsweise Sepharose, gekoppelten Peptid der in SEQ ID NO 1, 2, 3 oder 4 gezeigten Sequenz.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Kollagen oder Kollagenfragmente durch Immunisierung mit einem erfindungsgemäßen Antigen, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung derjenigen immortalisierten Milzzellen, welche den gewünschten Antikörper produzieren und Isolierung des Antikörpers aus den klonierten Zellen oder dem Kulturüberstand dieser Zellen.

Die Immunisierung erfolgt in den hierfür üblicherweise verwendeten Tieren, vorzugsweise werden Mäuse oder Kaninchen verwendet.

Die Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere erfolgt nach dem Fachmann geläufigen Verfahren, wie z.B. der Hybridomtechnik (Köhler und Milstein, Nature 256 (1975), 495 - 497) oder durch Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV-Transformation). Zum Nachweis derjenigen immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, wird eine Probe des Kulturüberstands in einem üblichen Immunoassay mit dem zur Immunisierung verwendeten erfindungsgemäßen Antigen inkubiert und untersucht, ob ein Antikörper an dieses Antigen bindet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen polyklonalen und monoklonalen Antikörper.

- 12 -

Diese polyklonalen und monoklonalen Antikörper reagieren nicht nur mit dem zur Immunisierung verwendeten erfindungsgemäßen Hapten, sondern gut mit Kollagen, sowie mit den in Körperflüssigkeiten gefundenen natürlichen Abbauprodukten von Kollagen. Bevorzugt wird das in der Probe vorkommende Kollagen oder dessen Fragmente denaturiert, wodurch die Bindung der erfindungsgemäßen Antikörper in den meisten Fällen erheblich verbessert wird.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können daher in Nachweisverfahren zur Bestimmung von Kollagen oder Kollagenfragmenten verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten in einer Probe unter Verwendung mindestens eines Antikörpers, der ein synthetisches lineares Peptid erkennt, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht, der dadurch gekennzeichnet ist, daß die Probe denaturiert wird. Am geeignetsten erwiesen hat sich der zuvor beschriebene kompetitive Immunoassay unter weiterer Verwendung der erfindungsgemäßen linearen Peptide. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper ist jedoch keineswegs auf den kompetitiven Immunoassay beschränkt. Die Antikörper können ebenfalls in anderen Testformaten, beispielsweise einem Sandwich-Immunoassay eingesetzt werden. Als zweiter Antikörper in diesem Immunoassay können beispielsweise Antikörper des Standes der Technik eingesetzt werden. Es muß lediglich darauf geachtet werden, daß die beiden Antikörper nicht miteinander um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren.

- 13 -

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung eines erfindungsgemäßen polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Bestimmung der Osteolyse durch Inkubation des Antikörpers mit einer Gewebeprobe und Bestimmung des an den Antikörper bindenden Kollagenabbauproduktes.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Testkombination zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten in einer Probe enthaltend in einem ersten Reagenz ein Protein-Denaturierungsmittel und trennt davon in einem zweiten Reagenz einen Antikörper, der ein synthetisches lineares Peptid erkennt, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht. Die Reagenzien liegen entweder in Form wässriger, vorzugsweise gepufferter, Lösungen vor, wobei als Puffer alle üblichen, dem Fachmann bekannten Puffer verwendet werden können, die die immunologische Reaktion nicht stören, oder aber in Form trockener, vorzugsweise lyophilisierter Gemische, die durch Zugabe eines geeigneten Lösungsmittels wie Wasser rekonstituiert werden können.

Zusätzlich können noch andere übliche Testzusätze wie Entstörsubstanzen, Proteine oder Detergenzien enthalten sein. Bevorzugt ist in der Testkombination noch zusätzlich ein synthetisches lineares Peptid, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht, als Bindepartner des Antikörpers enthalten. Das synthetische lineare Peptid kann entweder an einen Träger direkt gekoppelt oder aber an eine zweite Komponente gekoppelt sein, die die Bindung an die feste Phase vermittelt. Ebenfalls kann das Peptid an eine Komponente, die eine Markierung darstellt, gekoppelt sein.

- 14 -

Weiterhin kann in einem dritten Reagenz ein Standard zur Erstellung einer Standard- oder Eichkurve enthalten sein, der ein Antigen enthält, das ein synthetisches Peptid, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht, enthält.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Sequenzprotokollen näher erläutert.

SEQ ID NO 1 zeigt die Sequenz eines erfindungsgemäßen Peptids aus 9 Aminosäuren, wobei Xaa eine beliebige Aminosäure bedeutet.

SEQ ID NO 2 zeigt die Sequenz eines erfindungsgemäßen Peptids aus 16 Aminosäuren.

SEQ ID NO 3 zeigt die Sequenz eines erfindungsgemäßen Peptids aus 10 Aminosäuren.

SEQ ID NO 4 zeigt die Sequenz eines erfindungsgemäßen Peptids aus 13 Aminosäuren.

Beispiel 1**Peptidsynthesen**

Die eine Teilsequenz der Aminosäuresequenz von Kollagen aufweisenden Peptide der in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO 2 und 3 gezeigten Sequenzen werden mittels Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-Festphasenpeptidsynthese an einem a) Labortec SP 640 Peptide Synthesizer bzw. b) Zinsser Analytic SMPS 350 Peptidsynthesizer hergestellt.

a) Herstellung von Acetyl-Ser-Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Glu-Lys-Amid (SEQ ID NO 2)

In der angegebenen Reihenfolge werden jeweils 4,0 Äquivalente von folgenden Fmoc-Aminosäurederivaten eingesetzt:

Lys	mit tert. Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
Glu	mit tert. Butylester-Schutzgruppe
Gln	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Pro	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Pro	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Gln	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Pro	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Leu	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Phe	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Ser	mit tert. Butylether-Schutzgruppe
Phe	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Asp	mit tert. Butylester-Schutzgruppe
Phe	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Gly	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Ala	ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Ser	mit tert. Butylether-Schutzgruppe
Acetyl	Essigsäureanhydrid

- 16 -

Die Aminosäuren oder Aminosäurederivate werden in N-Methylpyrrolidon gelöst.

Das Peptid wird an 3 g 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy-Harz (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107) mit einer Beladung von 0,87 mmol/g synthetisiert (JACS 95 (1973), 1328). Die Kupplungsreaktionen werden bezüglich Fmoc-Aminosäurederivat mit 4,4 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid und 4,8 Äquivalenten N-Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid als Reaktionsmedium während 60 Minuten durchgeführt. Der Kupplungserfolg wird mittels Kaiser-Test (Anal. Biochem. 34 (1970), 595) an dem mit Isopropanol gewaschenen Syntheseharz kontrolliert. Sofern sich hierbei ein noch nicht vollständiger Umsatz ergibt, wird durch Nachkuppeln gemäß den oben angegebenen Bedingungen, der Umsatz vervollständigt. Nach jedem Syntheseschritt wird die Fmoc-Gruppe mittels 20%-igem Piperidin in Dimethylformamid in 20 Minuten abgespalten. Die Harzbeladung wird mittels UV-Adsorption der freigesetzten Fulven-Gruppe nach jeder Piperidinbehandlung ermittelt. Nach der Synthese beträgt die Beladung noch 0,68 mmol/g.

Die Freisetzung des Peptids vom Syntheseharz und die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgt mit 80 ml Trifluoressigsäure, 5 ml Ethandithiol, 2,5 g Phenol, 2,5 ml m-Kresol und 5 ml Wasser in 60 Minuten bei Raumtemperatur.

- 17 -

Die Reaktionslösung wird anschließend im Vakuum eingengegt. Der Rückstand wird in Diisopropylether aufgenommen, 1/2 - 2 Stunden kräftig gerührt und dann abfiltriert. Das Material wird dann mittels einer Gel-permeationschromatographie an Sephadex G15 vorgereinigt, wobei als Elutionsmittel 0,5 %-ige Essigsäure verwendet wird. Das erhaltene Rohmaterial wird anschließend abfiltriert und mittels einer präparativen HPLC an Nucleosil RP18 (Säule 40 mm x 250 mm 300 Å, 5 µm) über einen Gradienten von 100 % Puffer A (Wasser, 0,1 % Trifluoressigsäure) zu 100 % Puffer B (60 % Acetonitril, 40 % Wasser, 0,1 % Trifluoressigsäure) in 120 Minuten isoliert. Die Identität des eluierten Materials wird mittels Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie (FAB-MS) geprüft.

b) Herstellung von Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln  
(SEQ ID NO 3)

Das Peptid wurde an 30 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)phenoxy-Harz SA 5030 der Firma Advanced Chemtech mit einer Beladung von 0,47 mmol/g hergestellt. Von folgenden Fmoc-Aminosäure-Derivaten wurden zweimal je 140 µMol zusammen mit je 140 µMol 1-Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid DMF und 10 µMol N,N-Diisopropylcarbodiimid in DMF an das aufzubauende festphasen gebundene Peptid angekoppelt:

- 18 -

Glu	mit Trityl-Schutzgruppe
Ser	mit tert. Butyl-Schutzgruppe
Asp	mit tert. Butyl-Schutzgruppe
Pro	
Leu	
Phe	> jeweils ohne Seitenketten-Schutzgruppe
Gly	
Ala	

Die Kupplungszeiten betrugen 30 und 40 Minuten. Die Abspaltzeit betrug 20 Minuten und wurde mit einer Lösung von 50% Piperidin im DMF durchgeführt. Die Waschschrifte wurden mit DMF achtmal nach jedem Reaktionsschritt durchgeführt. Die Freisetzung des Peptids erfolgte durch Behandlung des vom Lösungsmittel abfiltrierten und mit Dichlormethan und Methanol gewaschenen Harz mit 1 ml einer Lösung von 90% Trifluoressigsäure, 3% Thioanisol, 3 % Ethandithiol und 3 % Thio-kresol innerhalb von 20 Minuten und 140 Minuten. Das Produkt wurde durch Zugabe vom 15 ml kaltem Diisopropylether zum vereinigten Filtrat ausgefällt und durch Filtration isoliert. Der Rückstand wurde in 50%iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Es wurden 8 mg weißes Lyophilisat einer Reinheit von 79% laut HPLC erhalten. Die Identität wurde mittels FAB-Massenspektroskopie bestätigt.

Das Peptid mit der Sequenz SEQ ID NO 4 Cys-Gly-Ser-Ala-Gly-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln wurde in analoger Weise hergestellt.

- 19 -

Beispiel 2

Aktivierung von Peptiden

Das gemäß Beispiel 1a) hergestellte Peptid wird durch Acylierung mit Maleinimidohexanoyl-N-hydroxysuccinimid (MHS) aktiviert. Dazu wird 0,1 mmol des Peptids in 20 ml 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 gelöst, mit einer Lösung von 0,1 mmol MHS in 6 ml Dioxan versetzt und 20 min. bei 20°C gerührt. Anschließend wird der pH-Wert mit Eisessig auf pH 4 eingestellt und das Reaktionsgemisch sofort lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 5 ml Wasser gelöst und über präparative HPLC an einer Waters Delta-Pak® C18-Säule (100 Å, 15 µm 50 x 300 mm) über einen Elutionsgradienten von 100 % A (Wasser 0,1 % Trifluoressigsäure) zu 100 % B (99,9 % Acetonitril 0,1 % Trifluoressigsäure) aufgereinigt.

- 20 -

Beispiel 3

**Herstellung von Immunogenen durch Kopplung von aktivierten Peptiden an Trägerproteine**

Beschrieben wird die Kopplung von aktivierten Peptiden an Keyhole Limpet Hemocyanine (KLH), Rinderserumalbumin (RSA) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ Gal). Zur Kopplung der nach Beispiel 2 mit MHS aktivierten Peptide ist es erforderlich, daß das Trägerprotein freie SH-Gruppen trägt.  $\beta$ Gal weist diese natürlicherweise bereits auf, erfordert also keine weitere Vorbehandlung. Bei KLH und RSA werden die NH<sub>2</sub>-Gruppen der  $\epsilon$ -Aminoseitenkette von Lysinresten durch Behandlung mit N-Succinimidyl-S-acetylthiopropionat (SATP) derivatisiert und dadurch in SH-Gruppen umgewandelt.

Man erhält somit ein Trägerprotein das eine gegenüber dem nativen Zustand erhöhte Anzahl von SH-Gruppen aufweist. Hierfür wird zu einer Lösung aus 1,39 g KLH in 500 ml 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 8,5 innerhalb von 20 min. 113,51 mg SATP (in 10 ml Dioxan gelöst) zugetropft. Nach 30 min. Rühren bei 20°C wird der pH-Wert der Reaktionslösung mit 0,1 mol/l Natronlauge auf pH 8,5 nachgestellt und weitere 24 Stunden gerührt. Die Lösung wird anschließend mit Hilfe einer Amiconzelle (Membran YM10) auf 100 ml aufkonzentriert, 3 x 24 Stunden gegen je 3 l 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 8,5/0,05 mol/l Natriumchlorid dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Zur Abspaltung der S-Acetylschutzgruppe werden 481 mg des KLH-SATP Lyophilisats in 20 ml 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 8,5/0,05 mol/l Natriumchlorid gelöst, mit 0,5 ml frisch zubereiteter 1 mol/l Hydroxylaminlösung versetzt und 90 min. bei 20°C gerührt.

- 21 -

7,23 mol des aus Beispiel 2 erhaltenen aktivierten Peptids in 4 ml Wasser werden zu dem derivatisierten Trägerprotein gegeben und 20 Stunden bei 20°C gerührt. Anschließend wird die trübe Lösung 2 x gegen 1 l 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 8,5/0,05 mol/l Natriumchlorid dialysiert. Das Dialysat wird zentrifugiert, der klare Überstand abdekantiert und lyophilisiert.

- 22 -

Beispiel 4

**Herstellung polyklonalaler Antikörper gegen lineare Kollagen-  
fragmente**

Je 5 Schafe wurden in an sich bekannter Weise mit dem Immuno-  
gen aus Beispiel 3 immunisiert. Die Immunogene enthielten das  
Peptid mit der in SEQ ID NO 2 genannten Sequenz, das den  
Aminosäuren Nr. 892 bis 907 in der Sequenz der  $\alpha$ -Kette von  
Kollagen Typ I entspricht. Als Trägerprotein diente KLH bzw.  
 $\beta$ -Galaktosidase. Die Tiere wurden in monatlichen Abständen  
mit den Immunogenen in kompletten Freundschen Adjuvans  
immunisiert. Die Dosis betrug 500  $\mu$ g je Tier und Immuni-  
sierung. Vier Monate nach Erstimmunisierung wurden Blutproben  
entnommen und die erhaltenen Antikörper auf Reaktion mit  
Kollagenfragmenten geprüft.

**ELISA zum Nachweis der Reaktion der Antiseren mit Kollagen-  
fragmenten**

Folgendes Material und Reagenzien wurden verwendet:

Mikrotiterplatten Maxisorp F96, Firma Nunc

Beschichtungspuffer: 50 mM Natriumcarbonat pH 9,6  
0,1 % NaN<sub>3</sub>

Inkubationspuffer: 10 mM Natriumphosphat pH 7,4  
0,1 % Tween 20  
0,9 % NaCl  
1 % Rinderserumalbumin

- 23 -

Substratlösung: ABTS®, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog Nr. 857424.  
Zur Verstärkung des Signals wurde der Lösung 2 mg/ml Vanillin zugesetzt.

Waschlösung: 0,1 % Tween 20  
0,9 % NaCl

Die Vertiefungen der Titerplatten wurden mit je 100 µl einer Lösung gefüllt, die 10 µg/ml Kollagenfragmente in Beschichtungspuffer enthielt. Die Kollagenfragmente wurden entsprechend den Angaben in EP-A-0 505 210 durch Protease-Verdauung von humanem Kollagen aus Knochen hergestellt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde dreimal mit Waschlösung gewaschen.

Die Antiseren wurden mit Inkubationspuffer 1 : 4000 verdünnt und je 100 µl in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit Waschlösung gewaschen.

Ein Konjugat aus Meerrettich-Peroxidase mit Kaninchen-Antikörpern gegen den Fc-Teil von Schaf-IgG wird im Inkubationspuffer bis zur Konzentration von 12,5 mU/ml verdünnt und die Näpfe der Mikrotiterplatte mit je 100 µl davon beschickt. Nach einer Stunde Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur werden die Titerplatten dreimal mit Waschlösung gewaschen.

100 µl Substratlösung werden hinzugefügt und inkubiert, bis eine Farbentwicklung deutlich wird (10 - 60 Minuten). Die Extinktion wird als Differenzmessung bei 405 und 492 nm erfaßt.

- 24 -

Die Seren der meisten Tiere zeigten eine starke Reaktion mit den Kollagenfragmenten auf der Festphase. Das Serum eines nicht immunisierten Tieres zeigte unter gleichen Bedingungen nur ein schwaches Meßsignal. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

$\beta$ -Galaktosidase		KLH	
Tier-Nr.	Extinktion	Tier-Nr.	Extinktion
1	1,05	1	1,16
2	1,18	2	2,62
3	1,49	3	1,28
4	0,48	4	1,42
5	> 2,70	5	1,81

In analoger Weise wurden Mäuse mit Immunogenen nach Beispiel 3 immunisiert und die Antiseren gewonnen. Die drei Antiseren 223/20, 241/13 und 242/2 waren besonders geeignet. Das Antiserum 223/20 entstammte einer Maus, die mit einem Decapeptid entsprechend SEQ ID NO 4 an KLH gekoppelt immunisiert wurde.

Das Antiserum 241/13 entstammte einer Maus, die mit einem Peptid aus 16 Aminosäuren Länge entsprechend SEQ ID NO 2 an KLH gekoppelt immunisiert wurde.

- 25 -

Das Antiserum 242/2 entstammte einer Maus, die mit einem Peptid aus 16 Aminosäuren Länge entsprechend SEQ ID NO 2 an  $\beta$ Gal gekoppelt immunisiert wurde.

Beispiel 5

**Bestimmung von Kollagen, sowie dessen Abbauprodukten in Körperflüssigkeiten über einen kompetitiven Test**

Die Vertiefungen einer 96-er Mikrotiterplatte werden gemäß EP-A 0 344 578 mit Streptavidin (100  $\mu$ l einer Lösung von 1  $\mu$ g/ml in PBS) bei 4°C über Nacht beschichtet und noch freie unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 300 $\mu$ l BSA (Rinderserumalbumin, 10 mg/ml) für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert.

Das Decapeptid mit der in SEQ ID NO 3 gezeigten Sequenz, das gemäß Beispiel 1b) hergestellt wurde, wird aminoterminal mit D-Biotinyl- $\epsilon$ -amidocapronsäure-N-succinimidester (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 1008960) gemäß Angaben des Herstellers biotinyliert. Das biotinylierte Peptid wird in PBS, 0,05% Tween 20, 1% BSA in einer Konzentration von 10ng/ml gelöst und durch 1-stündige Inkubation von 100 $\mu$ l je Vertiefung an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wird ungebundenes Peptid durch dreimaliges Waschen mit PBS, 0,05% Tween 20 entfernt.

- 26 -

Jeweils 150 µl der zu untersuchenden Probe (Serum, Plasma oder ein Standard) werden mit 150 µl des erfindungsgemäßen Antikörpers nach Beispiel 4 für 2 Stunden bei 37°C (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Jeweils 100µl dieses Ansatzes werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zu dem gebundenen Decapeptid gegeben und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei kann nur der nach der Inkubation mit der Probe noch nicht gebundene Antikörperüberschuß des Antiserums an das immobilisierte Decapeptid binden.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween 20 wird gebundener Antikörper durch anschließende Inkubation mit einem Kaninchen-Anti-Schaf IgG-POD Konjugat (Boehringer Mannheim GmbH) und ABTS® (1 mg/ml) nachgewiesen.

Mit dem erfindungsgemäßen Test (MTP Kompetitiver Test) wurden 164 Patienten-Seren vermesssen. Die Ergebnisse wurden zu Daten, welche mit einem Radioimmunoassay (RIA) ermittelt wurden, in Bezug gesetzt. Dieser RIA ICTP (Telopeptide ICTP [<sup>125</sup>I] von Orion Diagnostica, Finnland) basiert auf quervernetzten Kollagenfragmenten, welche durch enzymatischen Verdau und biochemische Verfahren hergestellt und isoliert werden. Aus Figur 1 geht nun hervor, daß das erfindungsgemäße Verfahren Meßwerte erbringt, die gut mit den RIA-Werten korrelieren, das heißt, das erfindungsgemäße Verfahren liefert klinisch relevante Daten. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,959 ermittelt.

- 27 -

Beispiel 6

**Einfluß von denaturierenden Reagenzien auf die Bestimmung eines C-terminalen Peptids aus Kollagen**

Wie im Beispiel 5 beschrieben wird das biotinylierte Decapeptid entsprechend SEQ ID NO 3 an mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten gebunden.

Alternativ wird ein Fragment von Kollagen, ein C-terminales Telopeptid (CTX), das nach Risteli (1993) hergestellt wurde, an die Oberfläche von Mikrotiterplatten (Nunc, Maxisorb) adsorbiert. Hierzu werden je 100 µl einer Lösung, die 1µg/ml CTX enthält, über Nacht bei 4°C in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte inkubiert. Freie unspezifische Bindungsstellen werden durch Inkubation mit 300 µl Rinderserumalbumin-Lösung (10 mg/ml in PBS) für zwei Stunden bei Raumtemperatur blockiert.

Als Probe wird eine CTX-Lösung verwendet. Diese wird entweder mit PBS-Lösung allein (Kontrolle), einer PBS-Lösung mit 3 M Kaliumrhodanid (KSCN) oder einer Lösung mit 1 % Tetradecyltriäthylammoniumbromid (TTAB) vorbehandelt. Gleiche Volumen der CTX-Lösung und der Puffer-Lösungen werden gemischt und eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 1 zu 10 mit einer PBS-Lösung, die 0,05 % Tween 20® enthielt, verdünnt, da die unverdünnten Denaturierungsmittel die Immunreaktivität der Antikörper beeinträchtigen könnte.

100 µl der so vorbereiteten Proben werden mit 100 µl einer Lösung eines polyklonalen Maus-Antikörpers in der Mikrotiterplatte, die entweder mit dem Decapeptid oder CTX, wie oben beschrieben, beschichtet waren, für eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS mit 0,05 % Tween 20® entfernt. Gebundener Antikörper wurde mit einem Schaf-Anti-Maus F(ab)-POD-Konjugat (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 117 2808) und ABTS® (1mg/ml) nachgewiesen.

Als Antiseren wurden die im Beispiel 4 beschriebenen Antiseren aus Mäusen 223/20, 241/13 und 242/2 benutzt, die vor dem Einsatz 1:2000 in PBS mit 0,05 % Tween 20® verdünnt wurden.

In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse (gemessenen Extinktionen) zusammengestellt. CTX in PBS ohne denaturierende Agenzien zeigt nur mit dem Mausserum 242/2 eine signifikante Kompetition. Die Verwendung der denaturierenden Reagenzien KSCN und TTAB bewirkt in allen Fällen eine drastische Erhöhung der Kompetition, auch bei den Antiseren, die ohne denaturierende Agenzien keine deutliche Kompetition zeigten.

- 29 -

Tabelle 2

Probenvorbehandlung	Antiserum 223/20	Antiserum 241/13	Antiserum 242/2
Kontrolle PBS	1,314	0,502	0,563
CTX nicht denaturiert	1,125	0,370	0,283
Kontrolle KCSN	1,202	0,443	0,562
CTX + KSCN	0,461	0,174	0,259
Kontrolle TTAB	0,873	0,217	0,471
CTX + TTAB	0,107	0,090	0,244

- 30 -

### PATENTANSPRÜCHE

1. Kompetitiver Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten in einer Probe, worin ein Bindepartner, der ein synthetisches lineares Peptid enthält, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereichs von Kollagen entspricht,  
mit einem Antikörper, der das synthetische lineare Peptid zu binden vermag,  
und der Probe inkubiert,  
und die Bindung des Antikörpers an den Bindepartner in geeigneter Weise bestimmt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe denaturiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das synthetische lineare Peptid einer Sequenz des nicht-helikalen C-terminalen Bereichs von Kollagen entspricht.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das synthetische lineare Peptid aus 5 bis 25 Aminosäuren und bevorzugt aus 8 bis 20 Aminosäuren besteht.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das synthetische Peptid der in SEQ ID NO 1, 2, 3 oder 4 gezeigten Sequenz entspricht.

- 31 -

5. Immunoassay nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Denaturierung der Probe vor der Inkubation mit dem Antikörper erfolgt.
6. Immunoassay nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Denaturierungsmittel TTAB oder KCSN verwendet wird.
7. Immunoassay zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten in einer Probe unter Verwendung mindestens eines Antikörpers, der ein synthetisches lineares Peptid erkennt, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe denaturiert wird.
8. Testkombination zum Nachweis von Kollagen oder Kollagenfragmenten in einer Probe enthaltend in einem ersten Reagenz ein Protein-Denaturierungsmittel und getrennt davon in einem zweiten Reagenz einen Antikörper, der ein synthetisches lineares Peptid erkennt, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht.
9. Testkombination nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein synthetisches lineares Peptid, das einer Sequenz des nichthelikalen C- oder N-terminalen Bereiches von Kollagen entspricht, enthalten ist.

SEQUENZPROTOKOLL

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Xaa Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Xaa  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Ser Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln Pro Pro Gln Glu Lys  
1 5 10 15

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln  
1 5 10

- 33 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

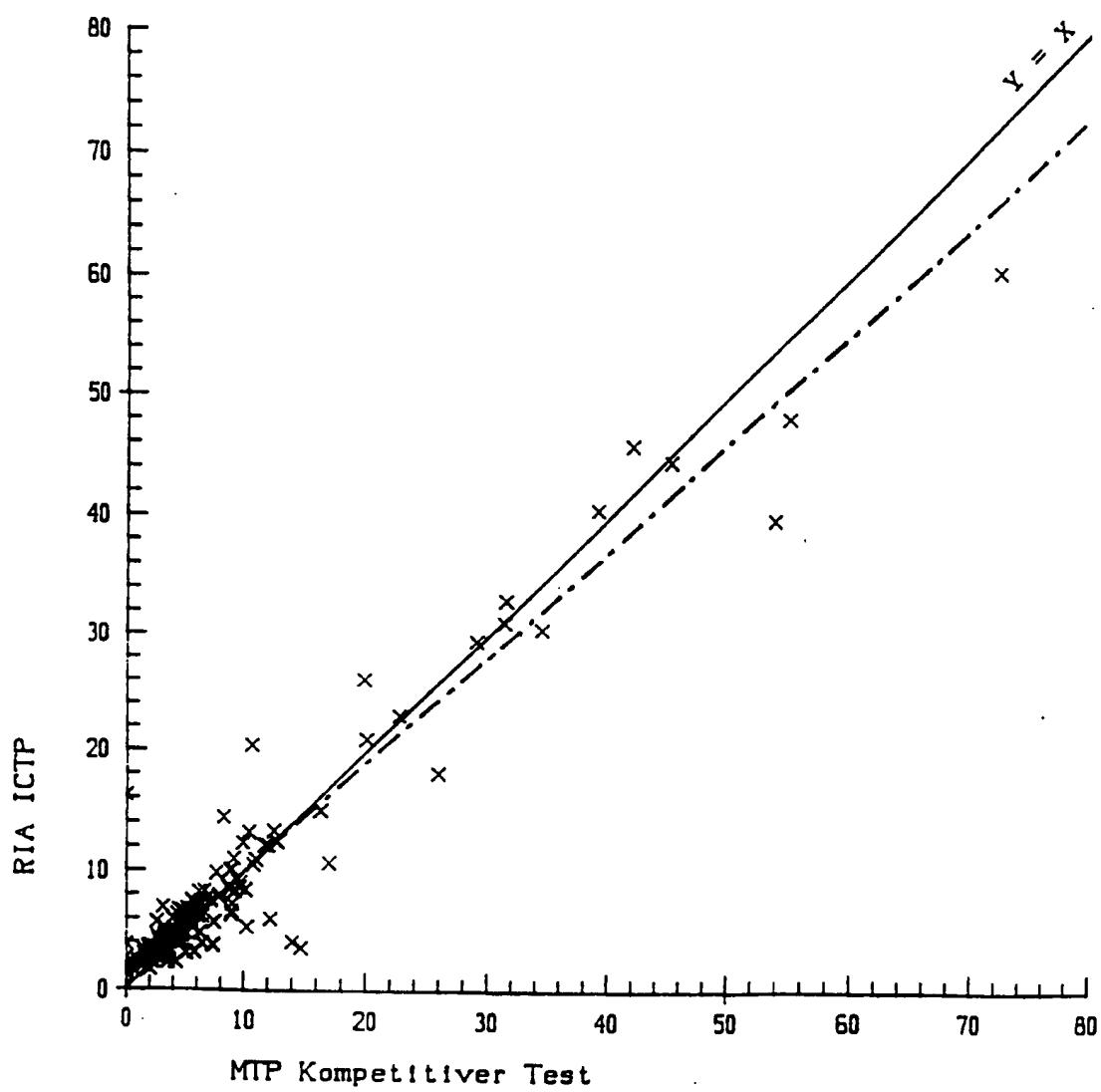
(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Cys Gly Ser Ala Gly Phe Asp Phe Ser Phe Leu Pro Gln  
1               5                   10

Fig. 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten	Application No
PCT/EP 94/00164	

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC 6	G01N33/68	C07K/06	C07K7/08	C12P21/08
				A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 298 210 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 11 January 1989 see the whole document ---	1,3,7-9
X	WO,A,90 08195 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 26 July 1990 see the whole document ---	1,3,7-9
Y	EP,A,0 465 104 (ORION-YHTYMA OY) 8 January 1992 see the whole document ---	2
Y	EP,A,0 465 104 (ORION-YHTYMA OY) 8 January 1992 see the whole document ---	2
A	see the whole document ---	1,3-11
Y	WO,A,91 09113 (REGENTS OF THE BOARD OF MINNESOTA) 27 June 1991 see page 1 - page 3 ---	2
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 1994

Date of mailing of the international search report

18.05.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hitchen, C

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Intern	Application No
PCT/EP 94/00164	

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 339 443 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 2 November 1989 see abstract; claims ---	1,7-9
A	BIOCHEMISTRY vol. 22 , 1983 pages 5213 - 5223 M.P.BERNARD ET AL. 'Nucleotide Sequences of Complementary Deoxyribonucleic Acids for the Pro alpha 1 Chain of Human Type I Procollagen. Statistical Evaluation of Structures That Are Conserved during Evolution.' cited in the application see page 5213 - page 5218 ---	1,4
A	BIOCHEMISTRY vol. 9, no. 24 , 1970 pages 4699 - 4706 E.M.CLICK ET AL. 'Isolation and Characterization of the Cyanogen Bromide Peptides from the alpha 1 and alpha 2 Chains of Human Skin Collagen,' cited in the application see abstract ---	1,4
A	EP,A,0 505 210 (ORION-YHTYMA OY) 23 September 1992 see the whole document ---	1,2,4
P,X	WO,A,93 15107 (D.J.BAYLINK ET AL.) 5 August 1993 see the whole document ---	1,7-9
A	EP,A,0 316 306 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 17 May 1989 Ziehe die Zusammenfassung; Seite 4, Zeilen 22-43; Seite 6, Zeile 54- Seite 7, Zeile 28. ---	1,5-8
A	EP,A,0 121 303 (NOCTECH LIMITED) 10 October 1984 see page 6, line 28 - line 36; claims ---	1,5-8
E	DE,A,42 25 038 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 3 February 1994 see the whole document -----	1-4,7-9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/00164

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0298210	11-01-89	DE-A-	3714634	17-11-88
		DE-D-	3886109	20-01-94
		JP-A-	63292061	29-11-88
WO-A-9008195	26-07-90	NONE		
EP-A-0465104	08-01-92	GB-A-	2245568	08-01-92
		JP-A-	4261199	17-09-92
WO-A-9109113	27-06-91	US-A-	5081031	14-01-92
EP-A-0339443	02-11-89	JP-A-	2013396	17-01-90
EP-A-0505210	23-09-92	NONE		
WO-A-9315107	05-08-93	NONE		
EP-A-0316306	17-05-89	US-A-	4647654	03-03-87
		US-A-	4658022	14-04-87
		US-A-	4727036	23-02-88
		AU-A-	3375589	17-08-89
		AU-B-	594651	15-03-90
		AU-A-	4926085	08-05-86
		DE-A-	3586679	29-10-92
		DE-D-	3587687	27-01-94
		DE-T-	3587687	07-04-94
		EP-A, B	0185870	02-07-86
		JP-A-	61172064	02-08-86
EP-A-0121303	10-10-84	AU-B-	572117	05-05-88
		AU-A-	2453384	11-10-84
		CA-A-	1233117	23-02-88
		CA-C-	1239581	26-07-88
		JP-A-	59168372	22-09-84
		US-A-	4619896	28-10-86
DE-A-4225038	03-02-94	WO-A-	9403813	17-02-94

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/00164

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	IPK 6 G01N33/68	C07K7/06	C07K7/08	C12P21/08	A61K39/395
--	-----------------	----------	----------	-----------	------------

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 6 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 298 210 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 11. Januar 1989 siehe das ganze Dokument ---	1,3,7-9
X	WO,A,90 08195 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 26. Juli 1990 siehe das ganze Dokument ---	1,3,7-9
Y	EP,A,0 465 104 (ORION-YHTYMA OY) 8. Januar 1992 siehe das ganze Dokument ---	2
Y	EP,A,0 465 104 (ORION-YHTYMA OY) 8. Januar 1992 siehe das ganze Dokument ---	2
A	siehe das ganze Dokument ---	1,3-11
Y	WO,A,91 09113 (REGENTS OF THE BOARD OF MINNESOTA) 27. Juni 1991 siehe Seite 1 - Seite 3 ---	2
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siche Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  
 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  
 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
28. April 1994	18.05.94
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Hitchen, C

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Inte	nales Aktenzeichen
PCT/EP 94/00164	

**C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 339 443 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 2. November 1989 siehe Zusammenfassung; Ansprüche ---	1,7-9
A	BIOCHEMISTRY Bd. 22 , 1983 Seiten 5213 - 5223 M.P.BERNARD ET AL. 'Nucleotide Sequences of Complementary Deoxyribonucleic Acids for the Pro alpha 1 Chain of Human Type I Procollagen. Statistical Evaluation of Structures That Are Conserved during Evolution.' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 5213 - Seite 5218 ---	1,4
A	BIOCHEMISTRY Bd. 9, Nr. 24 , 1970 Seiten 4699 - 4706 E.M.CLICK ET AL. 'Isolation and Characterization of the Cyanogen Bromide Peptides from the alpha 1 and alpha 2 Chains of Human Skin Collagen,' in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1,4
A	EP,A,0 505 210 (ORION-YHTYMA OY) 23. September 1992 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4
P,X	WO,A,93 15107 (D.J.BAYLINK ET AL.) 5. August 1993 siehe das ganze Dokument ---	1,7-9
A	EP,A,0 316 306 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 17. Mai 1989 Ziehe die Zusammenfassung; Seite 4, Zeilen 22-43; Seite 6, Zeile 54- Seite 7, Zeile 28. ---	1,5-8
A	EP,A,0 121 303 (NOCTECH LIMITED) 10. Oktober 1984 siehe Seite 6, Zeile 28 - Zeile 36; Ansprüche ----	1,5-8
E	DE,A,42 25 038 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 3. Februar 1994 siehe das ganze Dokument -----	1-4,7-9

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/00164

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0298210	11-01-89	DE-A- 3714634 DE-D- 3886109 JP-A- 63292061	17-11-88 20-01-94 29-11-88
WO-A-9008195	26-07-90	KEINE	
EP-A-0465104	08-01-92	GB-A- 2245568 JP-A- 4261199	08-01-92 17-09-92
WO-A-9109113	27-06-91	US-A- 5081031	14-01-92
EP-A-0339443	02-11-89	JP-A- 2013396	17-01-90
EP-A-0505210	23-09-92	KEINE	
WO-A-9315107	05-08-93	KEINE	
EP-A-0316306	17-05-89	US-A- 4647654 US-A- 4658022 US-A- 4727036 AU-A- 3375589 AU-B- 594651 AU-A- 4926085 DE-A- 3586679 DE-D- 3587687 DE-T- 3587687 EP-A, B 0185870 JP-A- 61172064	03-03-87 14-04-87 23-02-88 17-08-89 15-03-90 08-05-86 29-10-92 27-01-94 07-04-94 02-07-86 02-08-86
EP-A-0121303	10-10-84	AU-B- 572117 AU-A- 2453384 CA-A- 1233117 CA-C- 1239581 JP-A- 59168372 US-A- 4619896	05-05-88 11-10-84 23-02-88 26-07-88 22-09-84 28-10-86
DE-A-4225038	03-02-94	WO-A- 9403813	17-02-94

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.